380039-A　この説明書をよく読んでから使用してください。

研究用　　2008年2月作成（第1版）

プライマーセット 冷水病菌

（ Primer Set for *Flavobacterium psychrophilum*）

【特徴】

LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法は、① 1種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する[1),2)]，② 6領域を認識する4種類のprimerを使用するため特異性が高い，③ 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である，④ 増幅産物量が多く、簡易検出に適している[3),4),5),6)]，等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本試薬は Loopamp DNA 増幅試薬キットと組み合わせて使用する冷水病菌（*Flavobacterium psychrophilum*）のPPIC（peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C）[7)]遺伝子検出用のプライマーセットです。

【内容】

	48テスト分
（1）Primer Mix. CWD（PM CWD）※1	0.12 mL × 1 tube
（2）Positive Control CWD（PC CWD）※1	0.1 mL × 1 tube

※1：（　）内は、試薬チューブに記載されている表示です。

【使用法】

1．必要な器具・装置・試薬

- ○ マスターミックス調製用滅菌チューブ（0.5 mL 又は 1.5 mL）
- ○ ピペット（0.5～10μL，10～100μL，100～1,000μL）
- ○ フィルター付きチップ
- ○ 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- ○ 氷（クラッシュアイス）及びアイスボックス
- ○ 微量簡易遠心機
- ○ 8連マイクロチューブ用簡易遠心機
- ○ ボルテックスミキサー
- ○ Loopamp 反応チューブ
- ○ Loopamp リアルタイム濁度測定装置（適応機種 LA-320C、RT-160C）、又はインキュベーター
- ○ Loopamp DNA 増幅試薬キット中の 2×Reaction Mix.（RM），*Bst* DNA Polymerase（Bst DNA Polymerase），Distilled Water（DW）

2．検体の調製

検体からのDNA抽出は、アユ冷水病防疫に関する指針[8)]に記載されている方法に従ってください。

☆　検体の採取・取扱いに際しては、冷水病菌の環境への拡散防止及び検体へのDNAコンタミネーション防止対策をとってください。

☆　検体より抽出した DNA 溶液は、原則として直ちに使用してください（短期保存の場合は、2～8℃で保存）。また長期で保存する場合は、−80℃以下で保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。

なお、保存したDNA溶液をサンプルとする場合には、微量簡易遠心機で数秒間遠心し、95℃で5分間加熱処理してください。その後、室温で 2,000×g 以上で30秒間遠心して氷上に移し、上清をサンプル溶液とします。

3．試薬の調製

1）−20℃で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。

2）マスターミックスの調製（氷上で行ってください。）

別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2×Reaction Mix.（RM），*Bst* DNA Polymerase，Distilled Water（DW）と、本試薬の Primer Mix. CWD（PM CWD）を次表の割合で分注します。

＜試 薬＞	＜用量：1 test＞	＜用量：10 tests＞
2×Reaction Mix.（RM）	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. CWD（PM CWD）	2.5 μL	25 μL
Bst DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water（DW）	4.0 μL	40 μL
合　計	20.0 μL	200 μL

☆　調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

3）蛍光目視検出する場合（詳細は Loopamp 蛍光・目視検出試薬キットの手順に従ってください。）

上記マスターミックスの Distilled Water（DW）4μL のうち、1μL を Loopamp 蛍光・目視検出試薬とし、Distilled Water（DW）を3μL 加えて合計 20μL としてください。

4．操作法（詳細は Loopamp DNA 増幅試薬キットの手順に従ってください。）

1）マスターミックスとサンプル溶液の混合（氷上で行ってください。）

（1）氷上で Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20μL を分注します。

（2）サンプルの DNA、並びに陽性コントロールとして Positive Control CWD（PC CWD）を、陰性コントロールとして Distilled Water（DW）を5μL 添加し、全量 25μL とします。このとき、ピペッティング又はキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、8連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンダウンします。

☆　混合の際には気泡が立たないように注意してください。

☆　反応チューブにサンプル溶液が添加されていることを目視で確認してください。

2）増幅反応及び検出

（1）Loopamp リアルタイム濁度測定装置（適応機種 LA-320C、RT-160C）、又はインキュベーター（温度精度が±0.5℃以内：ホットボンネット付）を 65℃に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認します。

（2）分注済みの反応チューブをセットし、65℃，60分間インキュベートします。

（3）増幅反応後にヒートブロックを用いて酵素失活操作（80℃，5分間又は 95℃，2分間）を行って反応を停止させます。

☆　リアルタイム濁度測定装置を使用する場合、添付文書及び取扱説明書をよく読んでからご使用ください。

☆　リアルタイム濁度測定装置の場合、酵素失活は自動処理されます。

☆　インキュベーターを用いる場合は、別途必ず酵素失活操作を行ってください。

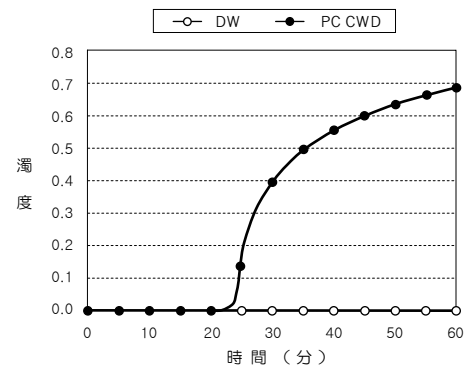
＜Loopamp リアルタイム濁度測定装置による検出＞

（1）Loopamp リアルタイム濁度測定装置（適応機種 LA-320C、RT-160C）の測定条件を冷水病菌検出用に合わせます。

（2）装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認します。陽性コントロール（Positive Control CWD（PC CWD））で濁度が上昇し、陰性コントロール（Distilled Water（DW））で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行しています（下図）。

それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施する必要があります。

（3）各検体の判定を行います。増幅反応時間内（60分間）に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とします。

☆　検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール（Positive Control CWD（PC CWD））と異なる場合があります。

図．Positive Control CWD（PC CWD）の増幅曲線パターン※2
（使用装置：Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C）

※2：本試薬の濁度立ち上がり時間と初期鋳型量の間に相関はありません。

＜蛍光目視による検出＞

（1）判定は、紫外線照射装置（波長 240～260nm、又は 350～370nm）を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して反応チューブの側面より観察し、陽性コントロール（Positive Control CWD（PC CWD））と同様に緑色の強い蛍光を発すれば陽性、陰性コントロール（Distilled Water（DW））と同様に蛍光を発しなければ陰性と判定します。

（2）観察は、目を眼鏡等で保護した状態で行ってください。

（3）記録する場合は、電気泳動撮影用カメラ等を用います。

☆　検体によって、陽性コントロールよりも強く蛍光を発することがありますが、蛍光の強さと鋳型量の間に相関はありません。

☆　重金属イオンを多量に含む飼育水で飼育された病魚試料を用いた場合、蛍光反応が阻害される可能性があります。

☆　紫外線照射装置を用いた判定が明確でない場合は、① 市販のブラックライトを反応チューブ底面よりあてて、チューブ側面より観察する。② 蛍光灯下で肉眼観察する。③ 電気泳動撮影用カメラで撮影し観察する。等の方法を適宜用いてください。

☆　本試薬を用いた検出例は、Eiken GENOME SITE（URL：http://loopamp.eiken.co.jp/）内の製品紹介ページをご参照ください。

【使用上又は取扱い上の注意】

1．本試薬は、学術研究目的のみにご使用ください。
2．本試薬で陰性判定であっても、*Flavobacterium psychrophilum* の存在を否定するものではありません。
3．本試薬は必ず－20℃で保存し、試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけを箱から取り出して使用してください（凍結融解を20回繰り返した結果では、試薬の劣化は認められませんが、無用な凍結融解は品質維持のため避けてください）。
4．試薬の汚染を避けるために、解凍後キャップを開ける前に必ずチューブをスピンダウンし、キャップを開けている時間も必要最小限としてください。
5．反応チューブは必ず専用の Loopamp 反応チューブをご使用ください。指定以外の反応チューブを使用した場合、光透過性の違いにより誤判定を招く可能性があります。
6．反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
7．反応チューブは用いる前にキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認してください。反応チューブにキズ・ヒビ等があると、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。Loopamp リアルタイム濁度測定装置（LA−320C、RT−160C）又はインキュベーターの反応ブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体へ漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。
8．反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。
9．蛍光目視判定時に紫外線照射装置を使用する場合、ランプより放射される紫外線（殺菌線）は有害で、点灯中のランプを短時間見つめただけでもあとで目が痛くなり、結膜炎に似た症状を起こしますので、紫外線を直接目に入れることは避けてください。また点灯中のランプを見る必要があるときは、必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけて判定してください。
10．遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありますので、本試薬の使用にあたっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。
11．本試薬の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った結果、判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。
12．外箱に表示の使用期限（Exp.Date）内に使用してください。
13．試薬チューブ及び反応チューブはＰＰ、キットケースは紙を主な材質としています。
14．使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

製　品　名	包装単位	貯蔵方法	有効期間	製品コード
Loopamp®プライマーセット 冷水病菌	48テスト分	−20℃	1年間	PM0006

【参考文献】

1）Notomi T. et al.: Nucleic Acids Research **28**, No.**12**, e63（2000）
2）Nagamine K. et al.: Clin. Chem. **47**, No.**9**, 1742−1743（2001）
3）Mori Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.**1**, 150−154（2001）
4）富田 憲弘, 他：第73回日本生化学会大会発表抄録集（2000）
5）森 安義, 他：第23回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集（2000）
6）富田 憲弘, 他：第26回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集（2003）
7）吉浦康寿 他：魚病研究，第**41**巻，67−71（2006）
8）アユ冷水病防疫に関する指針：アユ冷水病対策協議会（平成16年3月）

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社　お客様相談窓口
フリーダイヤル 0120−308−421

製造販売元　栄研化学株式会社
栃木県下都賀郡野木町野木143番地

380039−A